English Abstract for Reference AO

Abstract (Basic): DE 19740735 A

NOVELTY - Polyclonal and monoclonal antibodies specific for the Borrelia burgdorferi 24 kD antigen OspC are new.

INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following: (1) an antigen that immunoreacts with an antibody as above; (2) recombinant DNA encoding the antigen; and (3) a recombinant vector containing at least one copy of the DNA.

USE - The antibodies are useful for treatment or prevention of Lyme disease, preferably by intraperitoneal injection in unit doses of 0.1 mu g to 1 mg, optionally together with antibodies specific for the Borrelia burgdorferi 31 kD antigen OspA. The antibodies can also be used to isolate the OspC antigen by screening B. burgdorferi DNA libraries with the antibodies and isolating positive clones. The antibodies are also capable of curing or inhibiting the progression of arthritis and carditis in immunodeficient experimental animals (especially Scid mice) infected with viable pathogenic B. burgdorferi (especially the ZS7 strain), or are capable of inactivating the Spirochaetes in such animals.

This Page Blank (uspto)

**PCT** 

#### WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM Integnationales Büro

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6:

C12N 15/63, 15/31, A61K 39/40, C07K 16/12, 14/195

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 99/14345

A2 (43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

25. März 1999 (25.03.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP98/05852

(22) Internationales Anmeldedatum:

15. September 1998

(15.09.98)

(30) Prioritätsdaten:

197 40 735.8

16. September 1997 (16.09.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Hofgartenstrasse 2, D-80539 München (DE).

(72) Erfinder; und

- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SIMON, Markus, M. [DE/DE]; Sebastian-Kneipp-Strasse, D-79104 Freiburg (DE). ZHONG, Weimin [CN/DE]; Sundgau Allee 12, D-79106 Preiburg (DE). WALLICH, Reinhard [DE/DE]; Hermann-Löns-Weg 52, D-69118 Heidelberg (DE). KRAMER, Michael, D. [DE/DE]; Bergstrasse 85, D-64319 Pfungstadt (DE).
- (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: MEDICAMENT FOR TREATING A MANIFESTED LYME DISEASE
- (54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ZUR THERAPIE EINER MANIFESTEN LYME-BORRELIOSE

#### (57) Abstract

The invention relates to a pharmaceutical composition for treating lyme disease comprising an antibody as an active agent. Said antibody is specifically for the 24kDa-antigen (OspC) from B. burgdorferi, preferably an antibody which is specifically for the 24kDa-antigen (OspC) from B. burgdorferi represented by the sequence corresponding to SEQ ID NO. 2.

#### (57) Zusammenfassung

Eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit umfasst als Wirkstoff einen Antikörper, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, vorzugsweise einen Antikörper, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz ist.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gernäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
ΑT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE .	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die chemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF ·	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	ΊT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
СН	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	Сћіла	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		•
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		
1	•						

WO 99/14345 PCT/EP98/05852

- 1 -

# Arzneimittel zur Therapie einer manifesten Lyme-Borreliose Beschreibung

5

10

15

20

25

30

Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit und einen Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit sowie ein Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffes zur Behandlung der Lyme-Krankheit und ein Verfahren zur Gewinnung eines Impfstoffs gegen die Lyme-Krankheit.

Die Lyme-Borreliose ist eine von Zecken übertragene Infektionskrankheit, die durch Spirochete Borrelia burgdorferi hervorgerufen wird. Die Krankheit ist eine chronische progressive Infektion, die viele Organe, wie etwa die Haut, das zentrale und periphere Nervensystem, das Herz, die Leber, die Niere, das muskuluskelettale System und Gelenke befällt. Verschiedene Symptome, wie etwa akute Arthritis und Neuroborreliose, können spontan verschwinden, treten jedoch zumeist episodisch wieder auf. Spirocheten wurden wiederholt aus unbehandelten Patienten isoliert, und es gibt zahlreiche Anzeichen für persistente Infektionen selbst nach einer Therapie mit Antibiotika. Da eine zuverlässige Behandlung dieser Krankheit durch Therapie mit Antibiotika deshalb schwierig ist, werden große Anstrengungen unternommen, den Erreger selbst und die Immunantwort des Wirts auf Infektion mit B. burgdorferi zu erforschen. Bei den von der Lyme-Krankheit betroffenen Presonen wird zwar zumeist ein hoher Titer an Antikörpern gegen B. burgdorferi im Verlauf der Infektion festgestellt, der aber keinen Schutz gegen die Infektion bewirkt.

Es wurde festgestellt, dass das äußere Oberflächenlipoprotein A (OspA) von B. burgdorferi ein wirksamer Impfstoff für die Prophylaxe der Lyme-Erkrankung sein könnte (EP 0 418 827). Laboruntersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass ein weitgehender Schutz gegen eine Erkrankung in Infektion durch OspA-spezifische Antikörper erhalten werden kann (Schaible et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772).

PCT/EP98/05852

WO 99/14345

Diese Antikörper sind jedoch nur wirksam, wenn sie zur Zeit der Übertragung des Erregers vorliegen. Ein Grund hierfür könnte sein, dass OspA hauptsächlich auf Spirocheten in Zecken exprimiert wird, nach ihrer Transmission auf einen Säugerwirt jedoch nicht mehr exprimiert wird. Folglich können OspA-spezifische Antikörper zwar verwendet werden, um die Übertragung der Krankheit zu verhindern, sind aber wirkungslos und somit ungeeignet für therapeutische Anwendungen zur Behandlung der ausgebrochenen Krankheit. Kürzliche Untersuchungen zeigen, dass nach aktiver Immunisierung mit rekombinantem OspC Mäuse gegen eine Zecken-übertragene Infektion geschützt werden konnten (Preac-Mursic et al., Infection 20 (1992), 342-349; R.D. Gilmore et al., Infect. Immun. 64 (1996), 2234-2239). Das dort verwendete Immunisierungsprotokoll führt jedoch nicht zur Eliminierung von infektiösen Spirocheten vom Vektor, wie durch OspA-spezifische Antikörper gezeigt wurde.

15 .

10

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Arzneimittel zur Behandlung der Lyme-Krankheit bereitzustellen.

20

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24 kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist. Überraschenderweise wurde festgestellt, dass eine spontante Auflösung der Erkrankung und/oder Eliminierung von Spirocheten in verschiedenen Mausarten unter Verwendung von hohen Titern an OspC-spezifischen Antikörpern erzielt wurde. Bevorzugt umfasst die pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit als Wirkstoff einen Antikörper, der spezifisch für das 24 kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz ist.

30

25

Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass der passive Transfer von polyklonalem OspC-reaktivem Immunserum in B. burgdorferi-infizierte

scid-Mäuse zu einer vollständigen Auflösung von chronischer Arthritis und Carditis wie zur Eliminierung des Pathogens führt. Für eine wirksame Bekämpfung einer Infektion scheint ein kritischer Grenzwert von OspCspezifischen Antikörpern wichtig zu sein, der zwischen 3 und 10  $\mu$ g Anti-OspC-Antikörper liegt. Dies bedeutet, dass Spirocheten OspC im Säugerwirt exprimieren und für Schutzantikörper im betroffenen Gewebe während der Infektion empfindlich sind. Deshalb ist ein Angreifen von OspC für eine erfolgreiche therapeutische Behandlung der Lyme-Erkrankung relevant.

10

15

20

25

30

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass Immunseren aus B. burgdorferi-infizierten Mäusen einen vollständigen Schutz gegen eine Erkrankung und Infektion nur dann gewährleisteten, wenn sie vor, nicht aber wenn sie nach einer Inokulation mit dem Pathogen verabreicht wurden. In der vorliegenden Erfindung wird gezeigt, dass die spontane Auflösung der Infektion mit Antikörpern gegen OspC möglich ist, wobei die Spirocheten im Wirbeltier inaktiviert werden. Weiterhin wurde festgestellt, dass es möglich ist, mit polyklonalen OspC-spezifischen Immunseren sowohl Arthritis als auch Carditis aufzulösen und bestehende Spirochetinfektionen in C.B.-17 scid-Mäusen zu heilen, unabhängig davon, ob die Antikörper vor dem Auftreten (z.B. 10 Tage vor der Infektion) oder alternativ zu einem Zeitpunkt, an dem die Krankheit voll ausgebrochen (am 19. Tag nach Infektion) war oder es sich um eine chronische Erkrankung handelte (Tag 60 nach Infektion). Die vollständige Auflösung der Erkrankung und Eliminierung des Pathogens war Dosisabhängig und wurde mit 1  $\mu$ g bis 10 mg Anti-OspC- Antikörper/Maus, bevorzugt 5  $\mu$ g bis 20 µg Anti OspC-Antikörper/Maus erzielt.

Entzündliche Läsionen an Gelenken oder im Herzen von B. burgdorferiinokulierten scid-Mäusen wurden durch polyklonale Immunseren gegen OspC vollständig aufgelöst, selbst wenn sie zu einem Zeitpunkt verab-

10

15

20

reicht wurden, zu dem eine chronische Erkrankung vorlag, d.h. am 60. Tag p.i.

Nachstehend wird die Erfindung anhand der Figuren der Zeichnung und der Beispiele erläutert.

#### Figurenbeschreibung:

Figur 1 zeigt eine Western Blot-Analyse von NMS und IS, welche für passive Immunisierung von C.B.-17 scid-Mäusen verwendet wurden. Spur 1 zeigt einen Standard von Maus mAks gegen Hsp70 (70 kDa), Hsp60 (60 kDa), Flagellin (41 kDa), OspB (34 kDa), OspA (31 kDa), OspC (24 kDa), pLA7 (20 kDa) und p7,5 (7,5 kDa). Spur 2: NMS, gesammelt von naiven BALB/c-Mäusen. Spur 3: Polyklonales Immunserum, gebildet in BALB/c-Mäusen, immunisiert mit rLip-OspA in ABM2-Adjuvans. Spur 4: Polyklonales IS, gebildet in BALB/c-Mäusen, immunisiert mit rOspC in ABM2-Adjuvans, wie hierin beschrieben.

## Figur 2

Kinetik des Auftretens von B. burgdorferi-spezifischen (lgG) oder OspCspezifischen (IgM/IgG) Antikörpern (A) und Korrelationsanalyse von Serumgehalten von entweder Gesamt-B. burgdorferi-spezifischen oder OspC-spezifischen Antikörpern (IgG) und Elimination von Spirocheten von infizierten Mäusen (B). AKR/N, C57BL/6 und BALB/c-Mäuse (6 bis 8 Wochen alt) wurden durch Spritzeninjektion mit 10<sup>3</sup> Spirocheten in den 25 Schwanz (s.c.) infiziert. Die Mengen an B. burgdorferi-spezifischen (IgG) und OspC-spezifischen Antikörpern (IgM und IgG) in Seren von einzelnen Mäusen wurden mit ELISA unter Verwendung von entweder Gesamtzelllysaten (B. burgdorferi-Stamm ZS7) oder rOspC (ZS7) als Substrate untersucht. Die Daten stellen das Mittel von einzelnen untersuchten 30 Serumproben dar (AKR/N und C57BL/c: 10 Mäuse/Gruppe; BALB/c: 7 Mäuse; A). Korrelation zwischen Serumgehalten von Gesamt-B. burgdorferi-spezifischen IgG-Antikörpern, OspC-spezifischen IgG-Antikörpern (Tag 23 p.i.) und die Möglichkeit, Spirocheten aus Ohrgewebe zu rekultivieren (Tag 90 p.i.) wurde durch Korrelationsassay (B) analysiert.

Figur 3 zeigt die DNA-Sequenz und die Proteinsequenz des 24 kDa-Antigens (OspC) von B. burgdorferi (SEQ ID NO. 2)

Figur 4 zeigt die Konstruktion des Plasmids pG OspC-ZS, welches das OspC-Gen enthält.

Unterschiedliche therapeutische Wirkungen von Immunseren gegen OspA und OspC an etablierten B. burgdorferi-Infektionen von C.B.-17 scid-Mäusen Tabelle 1

	Transferiertes Serum (Do-	Maus Nr.			Klinisch	Klinische Arthritis (Tage p.i.)	age p.i.)			Ohrgewebe- kultur (Tage p.i.)
des Serum- trans- fers (Tage			10	19	30	40	50	70	80	40
	NMS 100 µl/Maus	- 2 E 4 E	-/± (±)/- -/- -/- -/-	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+ + + + +
<u>=</u>	Anti-OspA I.S. (3µg/Maus)	- 2 E 4 B	++++	++-	-/(±) -/- -/- -/-	(±)/- -/- -/- -/- -/-	(±)/- -/- -/- -/-	++++	++	

	+/+	++/++ +/++	++/++ ++/++ ++/++ + +-/++ +-/++ +-/++ +-/++ +-/++		-/- +	+/++	+	-/-	++/++ +/++	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	++/++   ++/++   ++/++   +/++		++/++   ++/++   ++/++   +/++   +/++   +		+		+/++	+	T ( T ) ( T )/-		++ ++ ++ +++ +++	+ ±/+ ±/+ -/± -/± ±/(±) -/(±)	+/++ ±/+ ±/+ -/± -/± -////////-
							-				_									_			
																٠.,							
						+/++	+	-/-							+ ~	-/-	+/++	+	+/(+)	+/+	-	=/( <del>+</del> )	+ /( + ) + /( + )
1	-/-	<b>#/</b> #	+/+	+/++	( <del>+</del> )/-				+/+	+/+	+/+		+/++	-					<b>1</b> / <del>1</del>	++/++		+/#	+ + +
	-/-		-/-	-/-	(+)/-				-/-	-/( <del>+</del> )		, ,	(+)	(+),					-/-	+/-		- +	+ + -
	<del></del>	2	က	4	2				-	- ~	1 0	, <	+ ц						-		`	νm	1 W 4
	NMS	100 µl/Maus			•				A cool	Anti-OspA	1.3.	(snew/fix/or)							Anti-OsoC	odso mil		(10,00/Mays)	s. (10μg/Maus)
						•		19 22	26, 30					_									

Therapeutische Wirkung eines Immunserums gegen OspC 60 Tage nach der Infektion von C.B.-17 scid-Mäusen mit 10³ B. burgdorferi-ZS7 Tabelle 2

Anti- OspC- Serum (µa/	Zeitab- stände des Serum-	Maus			Klinische Ar	Klinische Arthritis (Tage p.i.)	p.i.)		Ohrgev tur von cheten	Ohrgewebskul tur von Spiro- cheten
Maus)	trans- fers (Tage p.i.)		10	19	09	70	80	100	1. (d38)	2. (d80)
6,0	10,14, 19,22	332		++/++	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	+++++++++++++++++++++++++++++++++++++++	n.d. n.d. n.d.	+++
10		3 2 7	-/- -/- (±)/-	+/+ ++/+ ++/++	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	+ + + + + + + + + + + + + + + + + + + +	-/± -/- (±)/(±)	-/± + -/(±)	+ + +	

•

Histopathologische Untersuchung von betroffenen Organen aus einzelnen infizierten scid-Mäusen nach einer therapeutischen Behandlung mit Immunseren Tabelle 3

Zeitab- stände des	Transferiertes Serum (Do-	Necropsy- Tag p.i.	Klinische Arthritis		Histopathologische Untersuchung	hung	
Serum- transfers (Tage p.i.)	sis)			Gelenk	Herz	Leber	Muskel
Keine	Keine	10 27	-/(±) ++/++	++++	++	n.t.* ++	n.t. +
	NMS 100µl/Maus	.45	++/++	+ + +	+++		+
4	Anti-OspA I.S. (3µg/Maus)	45		+	1		•
	Anti-OspC I.S. (3µg/Maus)	45	-/-	.1	1		•

	NMS 100µl/Maus	45	++/++	++++	+ +	1	+
10,14,	Anti-OspA I.S. (10µg/Maus)	45	+ +/++	+ + +	+		#1
	Anti-OspC I.S. (10µg/Maus)	45	-/-				,
	NMS 100µI/Maus	45	++/++	+ + +	+ + +	+1	+
19,22, 26,30	Anti-OspA I.S. (10µg/Maus)	45	+ +/+ +	+ + +	+++++	#1	n.t. *
	Anti-OspC I.S. (10µg/Maus)	45	1/1	+		ı	1

nicht getestet

10

15

20

25

30

- 12 -

## Beispiel 1

Materialien und Methoden

## a) Mäuse und Infektion mit B. burgdorferi.

Ausgewachsene Mäuse der Stämme AKR/N (H-2<sup>k</sup>), C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), BALB/c (H-2<sup>d</sup>) und C.B.-17 scid (H-2<sup>d</sup>) wurden unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen gezüchtet. Zwischen 6 und 8 Wochen alte weibliche Tiere wurden für die Experimente verwendet. Die Mäuse wurden subkutan (s.c.) mit 1 x 10<sup>3</sup> niedrigpassagierten (zwei bis vier in vitro Passagen) Organismen B. burgdorferi des Stammes ZS7 (Schaible et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772) in den Schwanz geimpft.

## b) Rekombinante Antigene.

Ein vollständiges rekombinantes lipidiertes OspA (rLip-OspA) von B. burgdorferi, Stamm ZS7, wurde wie beschrieben (Gern et al., Immunol. Lett. 39 (1994), 249-258) hergestellt. Ein Glutathion-S-Transferase OspC Fusionsprotein (rOspC) von B. burgdorferi, Stamm ZS7, wurde unter Verwendung bekannter Techniken (R. Wallich et al., Infect. Immun. 64 (1995), 3327-3353) hergestellt.

## c) Polykionales immunserum.

BALB/c-Mäuse wurden mit entweder 10  $\mu$ g rLip-OspA oder 10  $\mu$ g rOspC in 100  $\mu$ l ABM2 Adjuvans (Sebak, Aldenbach, Deutschland) in den Schwanz geimpft und zweimal mit der gleichen Antigenpräparation in Abständen von 10 Tagen aufgefrischt. Das Immunserum (IS) wurde über einen Zeitraum von rund 2 Monaten nach der letzten Auffrischung gesammelt und enthielt die folgenden Konzentrationen von OspA- oder OspC-spezifischen Antikörpern (Ak), wie mit einem ELISA unter Verwendung von rLip-OspA oder rOspC als Substrat bestimmt wurde: Anti-OspA IS, 3,2 mg/ml bzw. Anti-OspC IS, 300  $\mu$ g/ml. Normales Mausserum (NMS) wurde von naiven BALB/c-Mäusen gesammelt. Die Spezifitäten

10

15

20

25

30

der erzeugten Immunseren und NMS wurden durch Western Blot-Analyse verifiziert. Wie in Figur 1 gezeigt (Spur 3, 4) reagierte ein polyklonales Immunserum von entweder OspA- oder OspC-immunisierten Mäusen selektiv mit Proteinen mit 31 kDa (OspA) bzw. 24 kDa (OspC) aus einem Gesamtzelllysat von ZS7 Spirocheten. Es wurde keine Reaktivität mit NMS gefunden (Figur 1, Spur 2).

- d) Analyse von Serumantikörpern durch ELISA und Western Blot. Serumantikörper gegen B. burgdorferi OspA bzw. OspC wurden durch einen Festphasen-ELISA, wie im Stand der Technik beschrieben (Kramer et al., Immunobiol. 181 (1990), 357-366), quantifiziert, wobei 1 µg/ml Gesamtzelllysat von B. burgdorferi, Stamm ZS7, rLip-OspA (ZS7) bzw. rOspC (ZS7) als Substrate verwendet wurden. Die Western Blot-Analyse wurde, wie im Stand der Technik beschrieben (M.M. Simon et al., J. Infect. Dis. 164 (1991), 123-132), unter Verwendung eines Gesamtzelllysats des B. burgdorferi-Stammes ZS7 als Antigenpräparation durchgeführt.
- e) Passiver Transfer von Immunserum zum Schutz vor und zur Behandlung einer Infektion.

Für passiven Schutz wurden 6 bis 8 Wochen alte weibliche C.B.-17 scid-Mäuse intraperitoneal (i.p.) entweder mit einem OspA- oder einem OspC-reaktiven polyklonalen Immunserum 1 Stunde vor der Infektion injiziert. Kontrollmäuse erhielten 100 µl NMS. Zur Infektion wurden die Mäuse s.c. mit 1 x 10³ B. burgdorferi ZS7 Organismen in den Schwanz injiziert. Alternativ wurden für die passive Behandlung einer bestehenden Infektion scid-Mäuse zunächst mit 1 x 10³ ZS7 Spirocheten (s.c.) infiziert, und es wurden ihnen anschließend wiederholt (vier mal in Abständen von 3 bis 4 Tagen) verschiedene Mengen von polyklonalem Immunserum verabreicht, das entweder für OspA oder Ospc spezifisch war (i.p.), wobei am Tag 10, 19 oder 60 nach der Infektion (p.i.) begonnen wurde. Die Tiere wurden hinsichtlich der Entwicklung von klinischer Arthritis in den

tibiotarsalen Gelenken beobachtet. Die Härte der Arthritis wurde in dem rechten und linken tibiotarsalen Gelenk wie folgt beurteilt: ++, schwer; + mäßig schwer; ±, milde Schwellung; (±), Rötung; -, keine klinischen Zeichen.

5

Zu den angegebenen Zeiten wurden die Mäuse hinsichtlich der Anwesenheiten von Spirocheten durch Kultivierung von Ohrgewebeproben untersucht, wobei, wie im Stand der Technik beschrieben, vorgegangen wurde (Sinsky et al., J. Clin. Microbiol. 27 (1989), 1723-1727).

10

15

25

30

Für histopathologische Untersuchungen wurden die Mäuse zu den angegebenen Zeiten nach der Infektion getötet. Das tibiotarsale Gelenk, das Herz, die Leber und die dem tibiotarsalen Gelenk benachbarten Muskeln wurden in 10 %igem Formaldehyd fixiert, in Paraffin eingebettet und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Die entzündeten Läsionen wurden wie folgt beurteilt: + + +, sehr schwer; + +, schwer; +, mäßig; ±, mild; -, keine.

## Beispiel 2

#### 20 Ergebnisse:

Drei Inzucht-Maus-Stämme, AKR/N, BALB/c und C57BL/6 mit unterschiedlicher Empfindlichkeit gegenüber einer B. burgdorferi-induzierten Erkrankung (U.E. Schaible et al., Eur. J. Immunol. 21 (1991), 2397-2405) wurden mit 10³ Spirocheten infiziert. Die Kinetik der spezifischen Antikörperantworten, der Entwicklung von Arthritis sowie der Beständigkeit von Spirocheten wurden bis zu 90 Tage nach der Infektion beobachtet. Alle mit B. burgdorferi geimpften Tiere waren infiziert, wie durch Serokonversion gezeigt (Figur 2A). Alle Tiere bildeten ähnliche Mengen von B. burgdorferi-spezifischen IgG-Antikörpern, welche zuerst am 14. Tag nach der Infektion nachweisbar waren und während dem gesamten Beobachtungszeitraum ständig anstiegen. Darüberhinaus entwickelten

alle Mäuse beträchtliche, aber variable Mengen von OspC-spezifischen lgM- und lgG-Antikörpern (Figur 2A). OspC-spezifische lgM-Antikörper waren zuerst am 4. Tag nach der Infektion nachweisbar, erreichten einen Höhepunkt am 14. Tag nach der Infektion und fielen danach auf Grundlinienwerte am 24. Tag nach der Infektion ab. OspC-spezifische IgG-Antikörper wurden zunächst am 14. Tag p.i. beobachtet mit einem Höhepunkt am 23. Tag p.i. (Höchstwerte für AKR/N, C57BL/6: etwa 8  $\mu$ g/ml; BALB/c: etwa 3  $\mu$ g/ml). Die Antikörpertiter in AKR/N- und C57BL/6-Mäusen nahmen im Laufe der Zeit ab, aber blieben bei detektierbaren Gehalten (etwa 3  $\mu$ g/ml) bis zu 90 Tagen p.i. Im Gegensatz dazu bildeten BALB/c-Mäuse geringere Mengen von OspC-spezifischen lgG-Antikörpern in der frühen Phase der Infektion, aber die Serumtiter nahmen im Verlauf der Zeit nach der Infektion zu. Wie von früheren Studien zu erwarten (Schaible et al., Immunol. Lett. 36 (1993), 219-226; L. Gern et al., J. Infect. Dis. 167 (1993), 971-975) wurden in keinem der Seren von infizierten Mäusen während des gesamten Beobachtungszeitraums von 90 Tagen Antikörper gegen OspA nachweisbar, weder durch ELISAnoch durch Western Blot-Analyse unter Verwendung eines spirochetalen Lysats oder rekombinantem OspA.

20

25

30

10

15

Eine enge Korrelation zwischen Serumtitern von Anti-OspC-Antikörpern und spontaner Auflösung der Infektion konnte gefunden werden. Wie in Figur 2B gezeigt war die Menge an OspC-spezifischen IgG-Antikörpern in den 8 Mäusen, aus denen keine Spirocheten rekultiviert werden konnten, beträchtlich höher als in solchen, von denen positive Kulturen erhalten wurden (10  $\pm$  5  $\mu$ g/ml gegenüber 4,8  $\pm$  2,8  $\mu$ g/ml). Auf der anderen Seite wurde keine Korrelation zwischen dem Gesamtgehalt an B. burgdorferi-spezifischen IgG-Antikörpern und Eliminierung von Spirocheten gefunden. Dies zeigt, dass OspC-spezifische Antikörper in der Lage sind, Spirocheten in Wirbeltieren zu inaktivieren und eine Infektion zu bekämpfen.

15

20

25

30

#### Beispiel 3

Es wurden Passivtransferexperimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob es mit polyklonalem IS, das spezifisch für rOspC ist, möglich ist, eine nachgewiesene B. burgdorferi-Infektion in scid-Mäusen zu heilen. Ein für rLip-OspA-spezifisches polyklonales Immunserum diente als Kontrolle. Es wurde herausgefunden, dass unterschiedliche Dosismengen von OspCspezifischen Antikörpern für die Prävention bzw. Behandlung der Infektion nötig waren. Ein passiver Transfer von 3  $\mu$ g OspC-spezifischen Antikörpern in scid-Mäuse 1 Stunde vor der Infektion führte zu einem vollständigen Schutz gegen die Erkrankung und Infektion in allen untersuchten Mäusen (Tabelle 1). Wie zuvor gezeigt, wurde ein vollständiger Schutz auch mit 3  $\mu$ g OspA-spezifischen Antikörpern, nicht aber mit Normal-Maus-Serum unter ähnlichen Bedingungen beobachtet (Tabelle 1 und M.M. Simon et al., J. Infect. Dis. 164 (1991), 123-132). Im Gegensatz dazu verhinderte eine wiederholte Verabreichung von 3  $\mu$ g/Maus OspC-spezifischen Antikörpern (4 x in Zeitabständen von 3 bis 4 Tagen), wobei am 10. Tag nach der Infektion begonnen wurde, einem Zeitpunkt, an dem sich Spirocheten verbreitet haben und die Entzündung von Gelenken und Herz anfängt, nur teilweise die Entwicklung von klinischer Arthritis. Spirocheten konnten in dieser Menge nicht inaktiviert werden.

Für die Passivtransferexperimente wurden deshalb Immunseren verwendet, die 10  $\mu$ g Anti-OspC-Antikörper enthielten. Wie in Tabelle 1 gezeigt, verhinderte ein solches wiederholt verabreichtes Immunserum (10  $\mu$ g, 4 × in Abständen von 3 bis 4 Tagen), wobei entweder am 10. oder 19. Tag nach der Infektion begonnen wurde, vollständig das Auftreten von und heilte aufgetretene klinische Arthritis in allen infizierten scid-Mäusen. Spirocheten konnten aus den Ohrgewebeproben nicht rekultiviert werden. Im Gegensatz dazu und wie aus früheren Untersuchungen erwartet (Schaible et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3768-3772) hatte ein wiederholter passiver Transfer von ähnlichen Mengen von anti-OspA-

10

15

spezifischen Antikörpern am 10. oder 19. Tag keine Wirkung auf klinische Arthritis und Infektion. Höchst bemerkenswert und überraschend ist es, dass anti-OspC-spezifische Antikörper in der Lage waren, eine chronische Erkrankung und Infektion in Mäusen aufzulösen. Dies wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass der passive Transfer des jeweiligen Immunserums, angefangen am 60. Tag p.i. zu einer beträchtlichen Verringerung von klinischer Arthritis innerhalb 10 Tagen nach der Behandlung und zu einer praktisch vollständigen Auflösung in den folgenden 30 Tagen führte (Tabelle 2). Während das Pathogen aus dem Ohrgewebe von allen infizierten scid-Mäusen vor der Behandlung (am Tag 38 p.i.) rekultiviert werden konnte, enthielt keine der Proben, die von den gleichen Tieren am 20. Tag nach dem Antikörpertransfer (Tag 80 p.i.) genommen wurden, detektierbare Mengen an Spirocheten. Kein Rückfall von klinischer Arthritis wurde bis zu 40 Tage nach der Behandlung beobachtet, unabhängig davon, ob das Immunserum (10  $\mu$ g/Maus anti-OspC-spezifische Antikörper) am 10., 19. oder 60. Tag p.i. transferiert wurde.

## Beispiel 4

20

25

30

Die therapeutische Wirkung eines polyklonalen Immunserums, das gegen OspC gerichtet ist, auf eine vorhandene Erkrankung und Infektion von scid-Mäusen wurde weiter durch histopathologische Untersuchungen der betroffenen Organe bestätigt. Wie in Tabelle 3 gezeigt, wurden signifikante histopathologische Veränderungen in den Gelenken, im Herz, in der Leber und im Muskel von infizierten, aber ansonsten unbehandelten scid-Mäusen oder solchen, die lediglich NMS erhielten, festgestellt. Wie bereits früher gezeigt wurde (U.E. Schaible et al., Am. J. Pathol. 137 (1990), 811-820) wurden chronische progressive Entzündungsveränderungen am meisten in tibiotarsalen Gelenken, im Herz und in der Leber festgestellt und bestanden während des gesamten Beobachtungszeitraums (45 Tage p.i.). Mäuse, die ein Immunserum erhalten hatten, das

10

20

25

30

entweder für OspC oder OspA (3 µg spezifische Antikörper/Maus) 1 Stunde vor der Infektion erhalten hatten, zeigten keine pathologischen Veränderungen an einem der vier Organe, wenn am 45. Tag p.i. untersucht. Darüberhinaus zeigten Mäuse, die ein gegen OspC gerichtetes Immunserum (10 µg spezifische Antikörper/Maus) am 10. oder 19. Tag nach der Inokulation erhalten hatten, wenn überhaupt nur geringfügige entzündete Läsionen in Gelenken, Herz, Leber und Muskel. Im Gegensatz dazu hatte gegen OspA gerichtetes Immunserum (10 µg spezifische Antikörper/Maus) keine Wirkung auf die Entwicklung oder Progression der Entzündung in den betroffenen Organen (Tag 19 p.i.).

## Beispiel 5

Herstellung von OspC-GST Fusionsprotein und Reinigung von rek. OspC

- Die Klonierung von OspC in den Expressionsvektor pGEX-2T wurde wie folgt durchgeführt:
  - 1) Amplifikation des OspC-Gens von Aminosäure 20 211 mittels PCR

(Primer: ATGGATCCAATAATTCAGGAAAAGATGGG und

ATGAATTCCTAAGGTTTTTTTGGACTTTCTACC)

- 2) Klonierung des PCR-Fragments in pGEX-2T nach BamHI/EcoRI-Verdau
- 3) Transformation von E.coli DH5a
- 4) Expression rek. OspC-GST entsprechend der Vorschrift des Herstellers (Pharmacia Biotech)
- 5) Anreicherung von OspC-GST über Gluthatione Seph. 4B-Säulen
- 6) Spaltung von OspC-GST mittels Thrombin und Reinigung. Hierzu wurden vier OspC-GST Protein-Präparationen über Nacht mit Thrombin Protease verdaut und OspC von GST über eine Glutation Seph. 4B-Säule getrennt.

30

## Patentansprüche

- Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der LymeKrankheit,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist.
- Pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
   dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi mit der in SEQ ID
   NO. 2 dargestellten Sequenz ist.
  - Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, dad urch gekennzeichnet, dass sie einen für OspC spezifischen polyklonalen Antikörper umfasst.
  - 4. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 1 oder 2, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass sie einen oder mehrere für OspC spezifische monoklonale Antikörper umfasst.
  - 5. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da durch gekennzeichnet, dass sie als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für rekombinantes OspC von B. burgdorferi des Stammes ZS7 ist.

10

15

20

30

6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, den Ansprüche, da durch gekennzeichnet, dass sie Antikörper der Klasse IgG und/oder IgM als Wirkstoff umfasst.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, da durch gekennzeichnet, dass sie zur intraperetonealen Verabreichung vorgesehen ist.

8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass sie 1 μg bis 10 mg Antikörper als Wirkstoff umfasst.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, den Ansprüche, da durch gekennzeichnet, dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen pathogenen B. burgdorferi Organismen infiziert wurden, das Fortschreiten von Arthritis und Carditis verhindert.

10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
den Ansprüche,
da durch gekennzeichnet,
dass sie in immundefizienten Scid-Mäusen, die mit lebensfähigen
pathogenen B. burgdorferi Organismen des Stammes ZS7 infiziert
wurden, das Fortschreiten von Arthritis und Carditis verhindert.

 Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,

15

20

dadurch gekennzeichnet,

dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen
pathogenen B. burgdorferi Organismen infiziert wurden, zur Heilung von Arthritis und Carditis führt.

- 12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
   da durch gekennzeichnet,
   dass sie in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen pathogenen B. burgdorferi Organismen infiziert wurden, zur Inaktivierung der Spirocheten führt.
  - 13. Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit, dadurch gekennzeichnet, dass er als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist.
    - 14. Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit,
      d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
      dass er als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für
      das 24kDa-Antigen (OspC) von B. burgdorferi mit der in SEQ ID
      NO. 2 dargestellten Sequenz ist.
- 15. Impfstoff nach Anspruch 13 oder 14,
   dadurch gekennzeichnet,
   dass er einen gegen OspC spezifischen polyklonalen Antikörper umfasst.
- 16. Impfstoff nach Anspruch 13 oder 14,
   d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
   dass er einen oder mehrere für OspC spezifische monoklonale
   Antikörper umfasst.

.10

15

20

25

- 17. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 16, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass er Antikörper umfasst, die spezifisch für rekombinantes OspC von B. burgdorferi des Stammes ZS7 sind.
- 18. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 17, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass er Antikörper der Klasse IgG und/oder IgM als Wirkstoff umfasst.
- 19. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 18, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass er in immundefizienten Versuchstieren, die mit lebensfähigen pathogenen B. burgdorferi Organismen infiziert wurden, die Ausbildung von Arthritis und Carditis verhindert.
- 20. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 19,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
  dass er 0,1 µg bis 1 mg Antikörper als Wirkstoff umfasst.
- 21. Impfstoff nach einem der Ansprüche 13 bis 20,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
  dass er weiterhin Antikörper umfasst, die spezifisch für das 31kDa
  Antigen (OspA) von B. burgdorferi sind.
- 22. Verfahren zur Gewinnung eines Wirkstoffs zur Behandlung der Lyme-Krankheit aus einem Versuchstier, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass man das Versuchstier mit OspC-Antigen impft und ein Immunserum gewinnt, welches für das OspC-Antigen spezifische Antikörper enthält.

20

- 23. Verfahren nach Anspruch 22, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t , dass man das Versuchstier mit rekombinantem OspC impft.
- 5 24. Verfahren nach Anspruch 23,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
  dass man BALB/c-Mäuse mit rekombinantem OspC dreimal in
  Abständen von 10 Tagen impft und das Immunserum über einen
  Zeitraum von 2 Monaten nach der letzten Verabreichung des
  Antigens gewinnt.
  - 25. Verfahren zur Gewinnung eines Impfstoffes gegen die Lyme-Krankheit aus einem Versuchstier, da durch gekennzeichnet, dass man das Versuchstier mit OspC impft und ein Immunserum gewinnt, das für OspC spezifische Antikörper enthält.
  - 26. Verfahren nach Anspruch 25,
    dadurch gekennzeichnet,
    dass man das Versuchstier mit rekombinantem OspC impft.
  - 27. Verfahren nach Anspruch 26,
    d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
    dass man BALB/c-Mäuse mit rekombinantem OspC dreimal in
    Abständen von 10 Tagen impft und das Immunserum über einen
    Zeitraum von 2 Monaten nach der letzten Verabreichung des
    Antigens gewinnt.
- 28. Polyklonaler Antikörper, erhältlich nach einem der Ansprüche 22

  bis 26,

  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,

  dass er für OspC spezifisch ist.

.10

15

20

- 29. Polyklonaler Antikörper, erhältlich nach einem der Ansprüche 22 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass er für OspC mit der in SEQ ID NO. 2 dargestellten Sequenz spezifisch ist.
- 30. Monoklonaler Antikörper gegen OspC.
- 31. Monoklonaler Antikörper gegen OspC der in SEQ ID NO.2 dargestellten Sequenz.
- 32. Antigen,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
  dass es mit einem Antikörper gegen OspC nach einem der Ansprüche 1 bis 21 immun reagiert.
  - 33. Antigen nach Anspruch 32,
    d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
    dass es die in Seq. ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz oder
    ein immunogenes Epitop aus dieser Sequenz umfasst.
- 34. Rekombinante DNA,
  d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
  dass sie für ein Antigen nach einem der Ansprüche 26 oder 27
  codiert und (1) die in Seq. ID NO. 1 dargestellte Nukleinsäuresequenz, (2) eine hier im Rahmen der Degeneration des genetischen Codes entsprechende Sequenz oder (3) eine mit der Sequenz aus (1) oder/und (2) unter stringenten Bedingungen hybridisierende Sequenz umfasst.
  - 35. Rekombinanter Vektor,
    dadurch gekennzeichnet,

dass er eine oder mehrere Kopien einer rekombinanten DNA nach Anspruch 34 enthält.

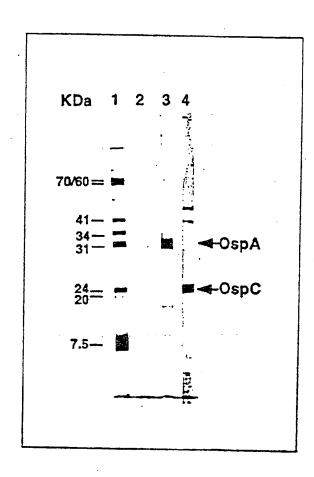
- 36. Verfahren zur Gewinnung von Antigenen nach einem der Ansprüche 32 oder 33,
  dadurch gekennzeichnet,
  dass man eine B. burgdorferi Genbank mit einem oder mehreren
  Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 18 untersucht und
  die Klone isoliert, welche mit dem oder den Antikörpern eine
  positive Immunreaktion zeigen.
- 37. Verfahren zur Gewinnung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung der Lyme-Krankheit oder eines Impfstoffes gegen die Lyme-Krankheit,
  dadurch gekennzeichnet,
  dass man Versuchstiere mit einem Antigen nach einem der Ansprüche 32 oder 33 immunisiert und aus dem immunisierten Versuchstier auf übliche Weise protektive, polyklonale oder monoklonale Antikörper gegen OspC gewinnt.
  - 38. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, zur Behandlung der Lyme-Krankheit.
  - 39. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, als Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit.

20

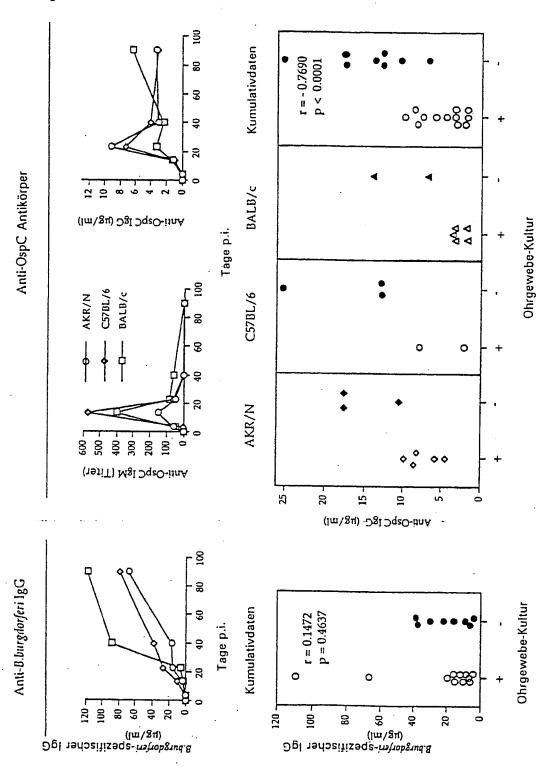
- 40. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 oder 39, dad urch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein polyklonaler Antikörper ist.
- 5 41. Verwendung nach einem der Ansprüche 38 oder 39, dad urch gekennzeichnet, dass der Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.
- 42. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als
  Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa
  Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung der Lyme-Krankheit.
- 43. Verwendung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die als
  Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa
  Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist, zur Herstellung eines Arzneimittels als Impfstoff gegen die Lyme-Krankheit.
- 44. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43,
  20 dadurch gekennzeichnet,
  dass der Wirkstoff ein polyklonaler Antikörper ist.
- 45. Verfahren nach einem der Ansprüche 42 oder 43,
  dadurch gekennzeichnet,
  dass der Wirkstoff ein monoklonaler Antikörper ist.
  - 46. Verfahren zur Behandlung der Lyme-Krankheit,
    d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
    dass einem an der Lyme-Krankheit erkrankten Patienten ein pharmazeutisches Präparat verabreicht wird, welches als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist.

47. Verfahren zur Prävention der Lyme-Krankheit,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t ,
dass einem Patienten ein Impfstoff verabreicht wird, der als Wirkstoff einen Antikörper umfasst, der spezifisch für das 24kDa
Antigen (OspC) von B. burgdorferi ist.

Figur 1



Figur 2



3/4

Figur 3: SEQ ID NO. 2

Gen-Sequenz und Protein-Sequenz des Outer-Surface-Protein C (OspC) isoliert aus dem europäischen Borrelia burgdorferi sensu stricto Stamm ZS7

1	atgasaagaatacattaagtgcaatattaatgactttattttat	60
-	tactttttcttatgtaattcacgttataattactgaaataaaaataaat	
61	aattcaggaaaagatgggaatgcatctgcaaattctgctgatgagtctgttaaagggcct	120
0.1	ttaagteettttetaceettacgtagacgtttaagacgactactcagacaatttcccgga N S G K D G N A S A N S A D E S V K G P	
121	aatcttacagaaataagtaaaaaaattacggattctaatgcggttttacttgctgtgaaa	
-4-	ttagaatgtetttatteatttttttaatgeetaagattaegeeaaaatgaaegaeaettt N L T E I S K K I T D S N A V L L A V K	
181	gaggttgaagcgttgctgtcatctatagatgagcttgctaaagctattggtaaaaaata	240
	ctccaacttcgcaacgacagtagatatctactcgaaacgatttcgataaccatttttttat EVEALLSSIDELAKAIGKKI	
241	aaaaacgatggtagtttagataatgaagcaaatcgcaacgagtcattgttagcaggagct	500
	tttttgctaccatcaaatctattacttcgtttagcgttgctcagtaacaatcgtcctcgagta N N D G S L D N E A N R N E S L L A G A	1
301	tatacaatatcaaccttaataacacaaaaattaagtaaattaaacggatcagaaggttta	- 500
	atatgttatagttggaattattgtgtttttaattcatttaatttgcctagtcttccaaa	<b>.</b>
361	aaggaaaagattgccgcagctaagaaatgctctgaagcatttactgacaaattaaaaaa	, , ,
	ttoottttotaacggcgtcgattotttacgagacttcgtaaatgactgtttaatttttt KEKIAAKKCSEAFTOKLKN	
421	gagcacgcaagtcttggtaaaaaagatgctactgatgatgatgcaaaaaaagctatttt	7 400
	ctcgtgcgttcagaaccattttttctacgatgactactactacgtttttttcgataaaa BHASLGKKDATDDDAKKAIL	.6
481	AAAgcaaatgcagcgggtaaagataagggcgttgaagaacttgaaaagttgtccggatc	7 320
	tttcgtttacgtcgcccatttctattcccgcaacttcttgaacttttcaacaggcctag KANAAGKDKGVEELEKLSGS	
541	ttagaaagettateaaaageagetaaagagatgettgetaatteagttaaagagettae	-+ 000
	aatetttegaatagttttegtegatttetetaegaacgattaagteaatttetegaatg L E S L S K A A K E M L A N S V K E L T	<i>,</i> -
603	agtcctgttgtggtagaaagtccaaaaaaaccttaa	
	tcaggacaacaccatcittcaggittititggaatt S P V V E S P K K P *	

WO 99/14345 PCT/EP98/05852

4/4

Figur 4

Plasmidname:

pG.OspC-ZS

Größe:

5,5 kb

Insert:

OspC Gen

Insert Größe: 0,6 kb

(Spezies)

ohne Signalsequenz (B.burgdorferi ZS7)

PCR-Fragment

Klonierungsvektor:

pGEX-2T (Pharmacia Biotech)

Klonierungsstelle:

BamHI/EcoRI

Antibiotikaresistenz:

Amp<sup>r</sup>

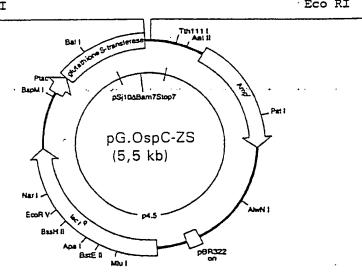
Eingabedatum:

1. 11. 94

## Thrombin

Leu Val Pro Arg Gly Ser Asn Asn Ser Lys Lys Pro \*
CTG GTT CCG CGT GGA TCC AAT AAT TCA - OspC - AAA AAA CCT TAG AAT TCA

BamHI Eco RI



PCT/EP98/05852

WO 99/14345 PCT/EP98

SEQUENZPROTOKOLL

1

#### (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER:
  - (A) NAME: Max-Planck-Gesellschaft zur Foerderung der Wissenschaften e.V.
  - (B) STRASSE: Hofgartenstrasse 2
  - (C) ORT: Muenchen
  - (E) LAND: DE
  - (F) POSTLEITZAHL: 80539
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Arzneimittel zur Theraphie einer manifesten Lyme-Borreliose
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
  - (B) COMPUTER: IBM PC compatible
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)
  - (v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG: ANMELDENUMMER: DE 19740735.8
- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 636 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: beides
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA
  - (ix) MERKMAL:
    - (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
    - (B) LAGE:1..636
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	AAA	AAG	AAT	ACA	TTA	AGT	GCA	ATA	TTA	ATG	ACT	TTA	TTT	TTA	TTT	48
Met	Lvs	Lys	Asn	Thr	Leu	Ser	Ala	Ile	Leu	Met	Thr	Leu	Phe	Leu	Phe	
1	•	-		5					10					15		
								•								

ATA TCT TGT AAT AAT TCA GGA AAA GAT GGG AAT GCA TCT GCA AAT TCT

11e Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Ala Ser Ala Asn Ser

20
25
30

GCT GAT GAG TCT GTT AAA GGG CCT AAT CTT ACA GAA ATA AGT AAA AAA Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys

ATT ACG GAT TCT AAT GCG GTT TTA CTT GCT GTG AAA GAG GTT GAA GCG 192

Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala
50 55 60

TTG CTG TCA TCT ATA GAT GAG CTT GCT AAA GCT ATT GGT AAA AAA ATA
Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile
65 70 75 80

AAA AAC GAT GGT AGT TTA GAT AAT GAA GCA AAT CGC AAC GAG TCA TTG
Lys Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu
85 90 95

WO 99/14345 PCT/EP98/05852 TTA GCA GGA GCT TAT ACA ATA TCA ACC TTA ATA ACA CAA AAA TTA AGT Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser 336 100 105 110 - AAA TTA AAC GGA TCA GAA GGT TTA AAG GAA AAG ATT GCC GCA GCT AAG Lys Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys 384 AAA TGC TCT GAA GCA TTT ACT GAC AAA TTA AAA AAT GAG CAC GCA AGT Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr Asp Lys Leu Lys Asn Glu His Ala Ser 432 130 CTT GGT AAA AAA GAT GCT ACT GAT GAT GCA AAA AAA GCT ATT TTA Leu Gly Lys Lys Asp Ala Thr Asp Asp Asp Ala Lys Lys Ala Ile Leu 480 150 155 AAA GCA AAT GCA GCG GGT AAA GAT AAG GGC GTT GAA GAA CTT GAA AAG Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys 528 TTG TCC GGA TCA TTA GAA AGC TTA TCA AAA GCA GCT AAA GAG ATG CTT Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu 576 180 185 GCT AAT TCA GTT AAA GAG CTT ACA AGT CCT GTT GTG-GTA GAA AGT CCA 624 Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Val Glu Ser Pro 200 AAA AAA CCT TAA 636 Lys Lys Pro \* 210 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2: (i) SEQUENZKENNZEICHEN: (A) LÄNGE: 212 Aminosäuren (B) ART: Aminosaure (D) TOPOLOGIE: linear (ii) ART DES MOLEKŪLS: Protein (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2: Met Lys Lys Asn Thr Leu Ser Ala Ile Leu Met Thr Leu Phe Leu Phe Ile Ser Cys Asn Asn Ser Gly Lys Asp Gly Asn Ala Ser Ala Asn Ser Ala Asp Glu Ser Val Lys Gly Pro Asn Leu Thr Glu Ile Ser Lys Lys Ile Thr Asp Ser Asn Ala Val Leu Leu Ala Val Lys Glu Val Glu Ala Leu Leu Ser Ser Ile Asp Glu Leu Ala Lys Ala Ile Gly Lys Lys Ile Lys Asn Asp Gly Ser Leu Asp Asn Glu Ala Asn Arg Asn Glu Ser Leu Leu Ala Gly Ala Tyr Thr Ile Ser Thr Leu Ile Thr Gln Lys Leu Ser 105 Lys Leu Asn Gly Ser Glu Gly Leu Lys Glu Lys Ile Ala Ala Ala Lys

Lys Cys Ser Glu Ala Phe Thr Asp Lys Leu Lys Asn Glu His Ala Ser

140

PCT/EP98/05852 WO 99/14345

$\sim$
~
J

Leu Gly Lys Lys Asp Ala Thr Asp Asp Asp Ala Lys Lys Ala Ile Leu 150 155

Lys Ala Asn Ala Ala Gly Lys Asp Lys Gly Val Glu Glu Leu Glu Lys

Leu Ser Gly Ser Leu Glu Ser Leu Ser Lys Ala Ala Lys Glu Met Leu 185

Ala Asn Ser Val Lys Glu Leu Thr Ser Pro Val Val Val Glu Ser Pro 195 200

Lys Lys Pro \* 210

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 29 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: beides(D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKŪLS: Genom-DNA
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

#### ATGGATCCAA TAATTCAGGA AAAGATGGG

29

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
  - (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
    - (A) LÄNGE: 33 Basenpaare
    - (B) ART: Nucleotid
    - (C) STRANGFORM: beides
    - (D) TOPOLOGIE: linear
  - (ii) ART DES MOLEKŪLS: Genom-DNA
  - (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATGAATTCCT 'AAGGTTTTTT TGGACTTTCT ACC